

---

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA/PEDIATRIA E  
SAÚDE DA CRIANÇA  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MAURO HENRIQUE MORAES VARGAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL SOBRE  
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E PULMONARES EM  
CAMUNDONGOS**

**PORTO ALEGRE  
2013**

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL-PUCRS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
MESTRADO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESTRESSE PRÉ-NATAL SOBRE PARÂMETROS  
COMPORTAMENTAIS E PULMONARES EM CAMUNDONGOS**

Mauro Henrique Moraes Vargas

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de  
Medicina da PUCRS para obtenção de título de Mestre em  
Medicina/Pediatria

Orientador: Márcio Vinícius Fagundes Donadio.

Co-orientador: Paulo Marcio Condessa Pitrez

Porto Alegre, 2013

---

---

## DADOS DE CATALOGAÇÃO

V297a Vargas, Mauro Henrique Moraes

Avaliação dos efeitos do estresse pré-natal sobre parâmetros comportamentais e pulmonares em camundongos / Mauro Henrique Moraes Vargas. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

55 f.: il.; tab.

Orientador: Márcio Vinícius Fagundes Donadio.  
Co-orientador: Paulo Márcio Condessa Pitrez.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança.

1. ESTRESSE PRÉ-NATAL. 2. DESENVOLVIMENTO PULMONAR. 3. COMPORTAMENTO. 4. ESTUDO EM MODELO ANIMAL COM CAMUNDONGOS. I. Donadio, Márcio Vinícius Fagundes. II. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. III. Título.

**CDD** 616.8

**CDU** 616.438 (043.2)

**NLM** WQ 175

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária:  
Isabel Merlo Crespo CRB 10/1201

---

---

## *Dedicatória*

*Aos meus pais, por todo amor, carinho e por seus ensinamentos sobre a vida.  
A todas as pessoas que de alguma forma, colaboraram com meu crescimento profissional.  
“Acredite em seus sonhos e lute com fé para torna-los realidade, isso só depende de você”.*

---

---

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar forças e lucidez nesta longa e desafiadora caminhada.

A toda minha família, em especial, meus pais por todo seu amor e apoio incondicional, por acreditarem que este sonho era possível. Ao grande amor da minha vida que é minha mãe, Synara, que sempre esteve ao meu lado mesmo estando longe, acreditou e lutou junto comigo para enfrentar cada obstáculo desta caminhada, torceu pelo meu sucesso e nos momentos mais difíceis com palavras motivacionais e de conforto que só ela consegue me proporcionar foi meu porto seguro. Ao meu pai, Luiz Henrique, pelo suor e esforço para a realização deste sonho.

Ao meu avô Mauro, meu grande ídolo, que em todos os desafios que enfrentei em minha vida ele sempre esteve ao meu lado me dando apoio e ajudando de diversas formas.

A meu orientador, Dr. Márcio V. F. Donadio, primeiramente pela amizade, por ter me dado uma chance de entrar para o mundo da pesquisa e ter confiado em meu trabalho. Agradeço muito pela paciência, conhecimento passado, apoio, orientações e disponibilidade durante o mestrado.

Ao professor e co-orientador, Dr. Paulo Marcio Condessa Pitrez, por abrir as portas do seu laboratório e confiar em meu trabalho. Agradeço por todo o ensinamento passado, todo estímulo que passa a cada dia, por mostrar o quanto é fascinante a pesquisa e por ser essa pessoa maravilhosa com um enorme coração.

Ao meu “quase irmão”, Rodrigo Godinho de Souza, meu braço direito, por toda ajuda e auxílio dentro do laboratório, por me escutar e dividir meus problemas nos momentos difíceis que passei, pelos momentos de alegria e gargalhadas que não foram poucas durante esse tempo.

Ao meu grande amigo, Cristian Roncada, por toda força que sempre me deu em tudo, pelas ajudas com os computadores e programas, sem esquecer, muita risada e momentos divertidos.

A Nailê Nuñez e Aline Andrea da Cunha por toda a ajuda para a realização dos experimentos e pela amizade verdadeira construída nesse período.

A Dr. Rita Mattiello, pela confiança e oportunidades, pelos ensinamentos sobre banco de dados e qualquer outro assunto que precisei.

Ao Dr. Edgar Sarria, pela amizade, ajuda e confiança fornecida durante esse período.

---

---

As bolsistas de iniciação científica que passaram durante este trabalho, Mayara Ferraz de Menezes e Bárbara Feijó Wunsch, pela cooperação e esforço para a realização dos experimentos, principalmente para a realização das análises comportamentais, onde parece que o tempo não passa.

A todas as outras pessoas do laboratório de Respirologia Pediátrica, vulgo “Lab 13”, por toda ajuda fornecida durante todo esse tempo, Raquel Cao, Gustavo Leivas, Lucien Gualdi, Géssica Antunes, Gabriela Souza, Alisson Schleich, Ana Cláudia Pereira.

Ao Tiago da patologia pela ajuda e dicas para coloração de lâminas.

A amigona Elis Mello, sempre ajudando de maneira rápida e eficiente.

A secretária do programa de pós-graduação, Carla Rothmann pelas dicas, informações e auxílios durante o curso e pela ajuda na formatação final da dissertação.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira tiveram uma contribuição para que este sonho se tornasse realidade.

---

---

## RESUMO

**Introdução:** O período pré-natal é de suma importância para o desenvolvimento e a maturação de diversos sistemas e órgãos essenciais.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do estresse pré-natal sobre as respostas comportamentais, assim como possíveis alterações estruturais e do padrão celular no pulmão em um modelo experimental com camundongos Balb/c.

**Materiais e Métodos:** Foram utilizadas fêmeas Balb/c primíparas. Após a identificação da prenhez, os animais foram divididos em 3 grupos: CTLE (controle), PNS 1 (estresse em dias intercalados a partir do 8º dia da prenhez) e PNS 2 (estresse a partir do 15º dia da prenhez até o nascimento). O estresse pré-natal foi realizado através de contenção. Os animais foram pesados ao nascimento, dia 10 e no desmame (dia 21). Quando adultos, foram analisados o comportamento de medo/ansiedade por meio dos testes de campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevada (LCE) e foi realizado lavado broncoalveolar (LBA) e análise histopatológica do pulmão.

**Resultados:** Não foram encontradas diferenças em relação ao peso dos animais entre os três grupos. A análise comportamental dos machos no teste do CA e LCE, não apresentou diferença significativa entre os grupos PNS 1 e PNS 2 em relação ao CTLE. Na análise do teste CA, as fêmeas do grupo PNS 1 apresentaram uma diminuição da distância total percorrida ( $p < 0,001$ ), aumento do tempo na periferia ( $p < 0,001$ ) e diminuição do tempo no centro ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo CTLE. O teste de LCE nas fêmeas não teve diferença significativa entre os três grupos. Quanto à análise do perfil celular no LBA e histologia pulmonar, também não houve diferenças entre os grupos.

**Conclusão:** O estresse pré-natal induz a alterações no comportamento de medo/ansiedade somente em camundongos Balb/c fêmeas e no modelo de estresse a partir do oitavo dia da prenhez, evidenciando que os efeitos do *programming* são possíveis nesse modelo. Por outro lado, o estresse pré-natal não provocou alterações basais no pulmão.

**Palavras-Chave:** estresse pré-natal. desenvolvimento pulmonar. comportamento.

---

---

## ABSTRACT

**Introduction:** The prenatal period is critical for the development and maturation of several organ systems essential.

**Objective:** To evaluate the effects of prenatal stress on behavioral responses, as well as possible structural changes and standard cell lung in an experimental model with Balb/c.

**Materials and Methods:** We used female Balb/c primiparous. After identification of pregnancy, the animals were divided into 3 groups: CTLE (control), PNS 1 (stress every other day from the 8th day of pregnancy) and PNS 2 (stress from day 15 of pregnancy until birth). The prenatal stress was accomplished through containment. The animals were weighed at birth, weaning and day 10 (day 21). As adults, we analyzed the behavior of fear/anxiety through field tests (AC) and elevated plus maze (EPM) was performed and bronchoalveolar lavage (BAL) and lung histopathology.

**Results:** No differences were found in relation to animal weight among the three groups. Behavioral analysis of the males in the test AC and EPM, showed no significant difference between groups PNS 1 and PNS 2 relative to CTLE. In the analysis of the test AC, females PNS 1 group showed a decrease in the total distance covered ( $P < 0.001$ ) increased time on the periphery ( $p < 0.001$ ) and decreased time the center ( $p < 0.001$ ) compared to the group CTLE. The test EPM in females was not significantly different among the three groups. The analysis of the cellular profile in BAL and lung histology, there were no differences between groups.

**Conclusion:** The prenatal stress induces changes in the behavior of fear/anxiety only in Balb/c mice and the stress model from the eighth day of pregnancy, suggesting that the effects of the programming are possible in this model. On the other hand, prenatal stress caused no alterations in basal lung.

**Keywords:** prenatal stress. lung development. behavior.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO III

- Figura 1. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental dos machos dos grupos (CTLE, PNS 1 e PNS 2) no teste do campo aberto.das seguintes variáveis: (A) distância total, (B) tempo no centro e (C) tempo na periferia**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental dos machos dos grupos (CTLE, PNS 1 e PNS 2) no teste do labirinto em cruz elevada.das seguintes variáveis: (A) distância total, (B) tempo nos braços abertos e (C) tempo nos braços fechados ..... **Erro! Indicador não definido.0**
- Figura 3. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental das fêmeas dos grupos (CTLE, PNS 1 e PNS 2) no teste do campo aberto.das seguintes variáveis: (A) distância total, (B) tempo no centro e (C) tempo na periferia**Erro! Indicador não definido.1**
- Figura 4. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental das fêmeas dos grupos (CTLE, PNS 1 e PNS 2) no teste do labirinto em cruz elevada.das seguintes variáveis: (A) distância total, (B) tempo nos braços abertos e (C) tempo nos braços fechados ..... **Erro! Indicador não definido.2**
- Figura 5. Análise histológica do tecido pulmonar ..... **Erro! Indicador não definido.3**
-

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO III

Tabela 1. Controle do peso dos animais..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2. Contagem diferencial de células do lavado broncoalveolar .... **Erro! Indicador não definido.**



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
CA	Campo aberto
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CTLE	Grupo controle
HPA	Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal
LBA	Lavado broncoalveolar
LCE	Labirinto em cruz elevada
PNS 1	Estresse pré-natal em dias intercalados a partir do 8° dia da prenhez
PNS 2	Estresse pré-natal a partir da última semana, todos os dias
SNC	Sistema nervoso central

---

---

# SUMÁRIO

## CAPÍTULO I

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	16
1.2 OBJETIVOS .....	17
1.2.1 Objetivo Geral .....	17
1.2.2 Objetivos Específicos .....	17
1.3 REFERÊNCIAS .....	18

## CAPÍTULO II

<b>2 ARTIGO DE REVISÃO .....</b>	<b>21</b>
----------------------------------	-----------

## CAPÍTULO III

<b>3 ARTIGO ORIGINAL .....</b>	<b>34</b>
--------------------------------	-----------

## CAPÍTULO IV

<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
-----------------------	-----------

---

---

# CAPÍTULO I

---

## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade de um organismo em se adaptar ao seu ambiente é de importância vital, pois a vida depende da manutenção de um equilíbrio dinâmico do meio interno, chamado de homeostase, o qual é desafiado constantemente por estímulos estressores<sup>1</sup>.

O termo estresse pode ser definido como um estado de homeostase alterado resultante da soma de respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos externos ou internos que permitem ao indivíduo superar certas exigências que o meio ambiente lhe proporciona, iniciando um processo de adaptação caracterizado, entre outras alterações, pelo aumento de secreção de adrenalina produzindo diversas manifestações sistêmicas como distúrbios fisiológicos, cognitivos e psicológicos<sup>2, 3</sup>. Já os estressores são todos os estímulos ou situações que fazem com que essa adaptação seja desencadeada, enquanto a reação ao estresse é a resposta que o organismo vai gerar em relação as alterações, ou seja, um mecanismo de defesa<sup>4</sup>.

O estresse está intimamente ligado à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e do sistema simpático adrenomedular (SAM)<sup>5, 6</sup>. A perturbação destes sistemas pode desencadear uma resposta fisiológica com início no sistema nervoso central (SNC), operando em níveis mais altos ou mais baixos do que os níveis homeostáticos normais, podendo levar a diversas alterações em diferentes órgãos, sistemas e suas funções<sup>7, 8</sup>. Como resultado desta ativação, o estresse possui uma resposta característica que é a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e glicocorticoides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos e camundongos) na corrente sanguínea<sup>9, 10</sup>.

A exposição a eventos estressantes durante o período do desenvolvimento pré-natal pode induzir a alterações duradouras em diversas funções dos sistemas neuroendócrinas e comportamentais ao longo da vida<sup>2, 3, 11</sup>. O conceito de que fatores não genéticos possam agir precocemente tendo repercussões permanentes ou re-organizar o sistema fisiológico é conhecido como programação (*programming*)<sup>4, 10</sup>.

O ambiente uterino, independente da susceptibilidade genética, influencia diretamente o desenvolvimento fetal, incluindo o sistema imunológico, implicando em maior risco ao desenvolvimento de doenças na vida adulta<sup>4, 12</sup>. A presença do estresse pré-natal e de

glicocorticóides, sejam endógenos ou exógenos, nas fases iniciais do desenvolvimento parece ser fundamental para o surgimento dessas doenças<sup>12, 13</sup>. Assim, muitos estudos vêm mostrando que o estresse no período pré-natal afeta a maturação de diversos sistemas (neurológico, endócrino, cardiovascular, etc) e órgãos essenciais<sup>14, 15</sup>, além de ressaltar também a importância do período e da intensidade em que o estresse é realizado<sup>5</sup>.

Desta forma, a presente dissertação apresenta um de revisão e um artigo original, intitulados, respectivamente, “Efeitos do estresse pré-natal em diferentes modelos experimentais: uma revisão da literatura” e “Avaliação dos efeitos do estresse pré-natal sobre os parâmetros comportamentais e pulmonares em camundongos”.

---

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Situações de estresse são cada vez mais comuns no nosso dia-a-dia. Com o passar dos anos, as mudanças de hábitos e costumes fazem com que o período gestacional esteja suscetível a diversos tipos de estresse, como transtornos diários do trabalho, trânsito, etc; influenciando as condições intra-útero ideais ao desenvolvimento do feto. Assim, muitos estudos vêm sendo feitos para que se possam conhecer melhor os mecanismos envolvidos na resposta do feto ou filhote a estímulos durante o período pré-natal. Estudos em modelos animais são essenciais para a melhora do entendimento destes mecanismos, doenças relacionadas ao estresse pré-natal e até mesmo para teste de medicamentos que possam inibir ou controlar possíveis alterações.

Além disso, a incidência de doenças respiratórias vem aumentando a cada vez mais nos dias atuais. A asma, por exemplo, é a doença respiratória de maior prevalência em crianças e quando não controlada pode levar a diversas complicações, afetando diretamente a qualidade de vida desses indivíduos. Considerando tanto essa como outras doenças que levam a limitações do sistema respiratório, é de suma importância estudar esses mecanismos, possibilitando o surgimento de medidas terapêuticas eficazes e aumentando as perspectivas de tratamento. Dentro deste contexto, é fundamental a pesquisa em modelos experimentais, sendo que, para o estudo das alterações do sistema respiratório, a linhagem mais utilizada são os camundongos Balb/c, tendo em vista o estabelecimento de modelos para estudo de diversos acometimentos, incluindo a fisiopatologia da asma. No entanto, ainda são escassos os estudos sobre os efeitos do estresse pré-natal nestes modelos.

Assim, considerando a importância do período pré-natal para o desenvolvimento e maturação de diversos órgãos e sistemas, esta dissertação aborda os efeitos do estresse pré-natal em um modelo murino com camundongos Balb/c.

---

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar os efeitos comportamentais e pulmonares do estresse pré-natal em um modelo experimental com camundongos Balb/c.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar possíveis diferenças sexuais nos efeitos do estresse pré-natal;
  - Avaliar os efeitos do estresse pré-natal sobre o comportamento de medo e ansiedade;
  - Avaliar os efeitos do estresse pré-natal sobre parâmetros histológicos e celulares no pulmão.
-

---

### 1.3 REFERÊNCIAS

1. Darnaudery M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain research reviews*. 2008;57(2):571-85.
  2. Wright RJ. Stress and atopic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1301-6.
  3. Margis R. [Comorbidities in posttraumatic stress disorder: rule or exception?]. *Rev Bras Psiquiatr*. 2003;25 Suppl 1:17-20.
  4. Wright RJ. Prenatal maternal stress and early caregiving experiences: implications for childhood asthma risk. *Paediatric and perinatal epidemiology*. 2007;21 Suppl 3:8-14.
  5. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008;32(6):1073-86.
  6. Russell JA, Douglas AJ, Brunton PJ. Reduced hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: central opioid inhibition and noradrenergic mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1148:428-38.
  7. Brunton PJ, Russell JA, Douglas AJ. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *Journal of neuroendocrinology*. 2008;20(6):764-76.
  8. Yeh CM, Huang CC, Hsu KS. Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *The Journal of physiology*. 2012;590(Pt 4):991-1010.
  9. Graeff FG. [Anxiety, panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis]. *Rev Bras Psiquiatr*. 2007;29 Suppl 1:S3-6.
  10. Brunton PJ, Russell JA. Prenatal social stress in the rat programmes neuroendocrine and behavioural responses to stress in the adult offspring: sex-specific effects. *Journal of neuroendocrinology*. 2010;22(4):258-71.
  11. Pallares ME, Scacchi Bernasconi PA, Feleder C, Cutrera RA. Effects of prenatal stress on motor performance and anxiety behavior in Swiss mice. *Physiology & behavior*. 2007;92(5):951-6.
  12. Warner JA, Jones CA, Williams TJ, Warner JO. Maternal programming in asthma and allergy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*. 1998;28 Suppl 5:35-8; discussion 50-1.
  13. Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *The Journal of endocrinology*. 2004;181(2):291-6.
  14. Hauser J, Feldon J, Pryce CR. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. *Hormones and behavior*. 2009;56(4):364-75.
-

15. Hodyl NA, Walker FR, Krivanek KM, Clifton V, Hodgson DM. Modelling prenatal bacterial infection: functional consequences of altered hypothalamic pituitary adrenal axis development. *Behavioural brain research*. 2007;178(1):108-14.

## CAPÍTULO II

## **2 ARTIGO DE REVISÃO**

**Título: Efeitos do estresse pré-natal em diferentes modelos experimentais: uma revisão da literatura**

**Autores: Mauro Henrique Moraes Vargas, Márcio Vinícius Fagundes Donadio**

---

**Resumo**

**Introdução:** A exposição a eventos estressantes durante o desenvolvimento pré-natal pode induzir a alterações duradouras em diversos sistemas.

**Objetivo:** Avaliar, através de uma revisão da literatura, os efeitos do estresse pré-natal em modelos experimentais sobre as repercussões geradas na vida adulta em diferentes sistemas.

**Materiais e Métodos:** Foi pesquisada a base de dados *Medline/Pubmed*, selecionando artigos originais em que foi realizado estresse pré-natal por contenção em roedores, publicados nos últimos dez anos, no idioma inglês, onde as palavras-chave deviam constar no título ou resumo: *prenatal stress* (estresse pré-natal), *programming* (programação) e *pregnancy* (gravidez), além de suas combinações.

**Resultados:** A maioria dos estudos realizados foi em ratos (91%), sendo que 56% utilizaram machos e fêmeas, 35% utilizaram somente machos e 9% somente fêmeas. Em relação ao estresse, 65% realizaram três vezes ao dia e 62% utilizaram 45 minutos, enquanto outros estudos variaram de 30 minutos até 6 horas. Em 72% dos estudos o estresse foi realizado na última semana da prenhes. No entanto, 40 % dos estudos mostram que os efeitos do estresse pré-natal foram sobre o desenvolvimento ou alteração de alguma estrutura no SNC, tais como, diminuição da proliferação celular e mudanças na expressão de proteínas no hipocampo, alterações de atividades enzimáticas no hipotálamo, etc.

**Conclusão:** Os resultados indicam que o estresse pré-natal provoca alterações permanentes em diversos sistemas, principalmente no SNC, nos mecanismos de regulação de comportamentos e da memória. O período gestacional parece ser importante na definição dessas alterações, assim como as diferentes respostas entre machos e fêmeas.

**Palavras-Chave:** estresse. roedores. período pré-natal. vida adulta.

---

**Abstract**

**Introduction:** Exposure to stressful events during prenatal development can induce lasting changes in various systems.

**Objective:** To evaluate, through a literature review, the effects of prenatal stress in different experimental models on the impact generated in adulthood in several systems.

**Materials and Methods:** We searched the Medline/Pubmed and selected original articles in which prenatal stress in rodents was performed by restraint, published in the last ten years, in English language, where the following keywords should appear on the title or summary: prenatal stress, programming and pregnancy, and their combinations.

**Results:** The majority of studies were conducted in rats (91%), and 56% used males and females, 35% used only males and 9% only females. Regarding the stress, 65% have used three times a day and 62% used 45 minutes, while other studies ranged from 30 minutes to 6 hours. In 72% of studies stress was performed in the last week of pregnancy. However, 40% of studies show that the effects of prenatal stress affected the development or altered some structure in the central nervous system (CNS), such as, decreased cell proliferation, and changes in protein expression in the hippocampus, changes in enzymatic activity in the hypothalamus, etc.

**Conclusion:** The results indicate that prenatal stress causes permanent changes in many systems, especially in the CNS, as well as in the mechanisms of behavior and memory regulation. The gestational period appears to be important in defining these changes, as well as the different responses between males and females.

**Keywords:** stress. rodents. prenatal period. adulthood.

---

## Introdução

Situações que geram estresse são cada vez mais comuns entre as pessoas, fazendo com que muitos estudos tenham sido conduzidos para avaliar os efeitos do mesmo. O termo estresse denota o estado gerado pela percepção de estímulos, internos ou externos, que geram excitação emocional, levando a alteração do estado de homeostase, juntamente com um processo de adaptação que permite ao indivíduo superar certas exigências que o meio ambiente lhe proporciona<sup>1, 2</sup>. Estes estímulos ou situações que geram estresse são denominados estressores e a resposta do organismo é a reação ao estresse. Esta resposta compreende aspectos cognitivos, comportamentais e fisiológicos, visando propiciar uma melhor percepção da situação e de suas demandas, possibilitando uma busca de soluções, selecionando condutas adequadas e preparando o organismo para agir de maneira rápida e vigorosa<sup>3, 4</sup>.

A resposta clássica ao estresse consiste na ativação do sistema simpático e adrenomedular e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). É a perturbação do equilíbrio desses sistemas que pode contribuir para a geração de diversos distúrbios. Sob ameaça, o organismo desencadeia uma complexa resposta fisiológica que se inicia no âmbito do sistema nervoso central (SNC), levando a alterações neuroendócrinas, imunológicas, psicomotoras e psicológicas. Esta reação poderá ocasionar modificações importantes na pressão arterial, frequência cardíaca, além de complicações gástricas e respiratórias<sup>2, 3, 5</sup>.

Diferentes tipos de estímulos resultam em distintos tipos de estresse, tais como o estresse químico, físico, psicológico (ou um conjunto de fatores ambientais e emocionais), entre outros<sup>1</sup>. Dependendo do período da vida humana ou animal em que estas situações ocorrem, respostas e consequências específicas serão produzidas. Quando há estresse durante a gestação, no período denominado pré-natal, uma série de repercussões podem ocorrer para o filhote, tendo em vista que nele se inicia o desenvolvimento e a maturação de diversos sistemas (neurológico, cardiovascular, endócrino, etc.) e órgãos essenciais<sup>6, 7</sup>. Este processo, conhecido como *programming* ou programação, é definido com base no conceito de que fatores não genéticos possam agir precocemente tendo repercussões permanentes na reorganização de sistemas fisiológicos<sup>8</sup>. Novas evidências vêm sendo publicadas nos últimos anos mostrando que a exposição a eventos estressantes durante o desenvolvimento pré-natal pode induzir alterações duradouras em diversas funções dos sistemas neuroendócrino e comportamental em animais<sup>9-11</sup>. Estes efeitos persistem durante toda a vida do animal e são

---

acompanhados por alterações na expressão de receptores de hormônios relacionados ao estresse (corticoesterona e vasopressina) em diversas regiões do cérebro (hipotálamo, hipocampo e amígdala)<sup>12, 13</sup>. Da mesma forma, há mudanças no comportamento aversivo, de medo e ansiedade, aprendizagem e memória quando adultos<sup>12, 14, 15</sup>, além de alterações em parâmetros hemodinâmicos e cardiovasculares, entre outros.

Considerando a frequência das situações de estresse e a importância do período pré-natal para o desenvolvimento dos organismos, este estudo tem como objetivo avaliar, através de uma revisão na literatura, os efeitos do estresse pré-natal em modelos experimentais sobre as repercussões geradas na vida adulta em diferentes sistemas. Além disso, buscou-se fazer um levantamento dos principais períodos de exposição ao estresse na gestação, assim como as diferentes intensidades de estímulo e as suas consequências.

## **Materiais e Métodos**

O presente estudo consiste em uma revisão bibliográfica realizada por meio de uma pesquisa no banco de dados Medline/Pubmed. Foram selecionados somente artigos originais em que foi realizado estresse pré-natal por contenção em animais roedores (rato e camundongo), publicados nos últimos dez anos, no idioma inglês, onde as palavras-chave deviam constar no título ou resumo. As palavras chaves utilizadas foram *prenatal stress* (estresse pré-natal), *programming* (programação) e *pregnancy* (gravidez), além de suas combinações. Foram excluídos desta revisão bibliográfica artigos que realizaram outros tipos de estresse pré-natal, outras espécies de animais e também aqueles que não se enquadraram nos objetivos desta revisão. Todos os artigos oriundos das buscas realizadas tiveram o seu título e resumo analisados. Em caso de dúvidas sobre a inclusão, o texto completo foi verificado.

Após a seleção dos artigos, foi realizada a leitura dos mesmos utilizando-se um instrumento de sistematização da análise dos métodos e principais resultados dos estudos. Desta forma, os principais aspectos de cada artigo selecionado foram colocados em uma tabela, para a realização de uma análise crítica dos parâmetros avaliados e dos resultados contidos nos mesmos.

---

## Resultados e Discussão

Através de uma busca com a união dos termos *prenatal stress* e *programming*, encontrou-se 84 (oitenta e quatro) artigos, sendo que foram selecionados 7 (sete) artigos. Quando utilizados os termos *prenatal stress* e *pregnancy* foram encontrados 208 (duzentos e oito) artigos e, destes, 25 (vinte e cinco) foram incluídos. Dos 292 (duzentos e noventa e dois) artigos pesquisados com os termos citados anteriormente, 67 (sessenta e sete) foram excluídos por serem revisões e outros 193 (cento e noventa e três) não foram incluídos por não estudarem o tema em questão. Ao todo 32 (trinta e dois) artigos foram selecionados para esta revisão.

De acordo com os critérios de seleção utilizados, todos os estudos selecionados foram realizados com roedores, sendo que a maioria foi em ratos 29/32 (91%), e o restante 3/32 (9%) em camundongos. Quanto à linhagem dos animais, nos estudos com ratos, 18 eram com *Sprague-Dawley*<sup>11, 12, 16-31</sup> e 11 com *Wistar*<sup>10, 13, 14, 32-39</sup>. Já nos estudos com camundongos, todos eram da linhagem *Swiss*<sup>9, 15, 40</sup>. Em relação ao sexo dos animais, a maioria dos estudos (56%) avaliou machos e fêmeas<sup>9-11, 13, 14, 19-26, 29-31, 34, 37</sup>, enquanto que 35% foram somente em machos<sup>15, 16, 18, 27, 28, 32, 35, 36, 38-40</sup> e 9% somente com fêmeas<sup>12, 17, 33</sup>. Quanto ao tipo de estresse, seguindo os critérios de inclusão, todos utilizaram contenção, sendo que 22% destes, além da contenção, utilizaram uma associação com iluminação específica feita por lâmpada<sup>10, 19, 25, 31, 36-38</sup>. O estresse com frequência de três vezes ao dia foi o mais utilizado (21)<sup>9, 11-13, 16-19, 21-28, 31, 32, 35, 37, 39</sup>, seguido de uma vez ao dia (8)<sup>10, 14, 15, 29, 30, 36, 38, 40</sup>, duas vezes ao dia (2)<sup>20, 34</sup> e quatro vezes ao dia (1)<sup>33</sup>. O tempo de duração do estresse também variou entre os artigos selecionados, com períodos de tempo compreendidos entre 30 minutos até 6 horas. O tempo de 45 minutos foi a duração escolhida na grande maioria dos trabalhos (62%).

Em relação ao período da prenhez em que o estresse foi realizado, foram encontrados estudos na primeira, segunda e terceira semanas, assim como durante todo o período de prenhez. O período mais utilizado para a realização do estresse foi o da última semana com 72%<sup>9-14, 17-22, 24-26, 29, 30, 32, 33, 35, 36, 38, 39</sup>. Os diferentes períodos gestacionais são de suma importância para o desenvolvimento do filhote, tendo em vista que durante esses períodos ocorre o desenvolvimento e a maturação de diversos órgãos e sistemas<sup>19, 32, 41</sup>. Por exemplo, diferentes tipos de estresse pré-natal afetam o desenvolvimento do SNC de forma particular dependendo do momento em que ocorrem no período gestacional, sendo mais grave e

causando maiores alterações no SNC quando o estresse é realizado no período da segunda semana da gestação<sup>41</sup>. Já em relação ao desenvolvimento pulmonar, em roedores inicia-se aproximadamente no 9º dia de gestação e divide-se em quatro estágios, pseudoglandular (inicia do 9º ao 16º dia de gestação), canicular (16º ao 17º dia da gestação), sacular (17º dia de gestação até o 5º de vida do filhote) e alveolar (5º dia de vida até o 30º)<sup>42</sup>. No entanto, os possíveis efeitos do estresse nestes períodos ainda não são conhecidos.

Muitos desfechos foram estudados nos diferentes artigos selecionados. Diversos estudos (40%)<sup>11, 16, 21-24, 26, 32, 33, 35, 36, 39, 40</sup> analisaram os efeitos do estresse pré-natal sobre o desenvolvimento ou a alteração de alguma estrutura no SNC. Dentre estes, muitos analisaram áreas específicas, tais como, hipocampo, hipotálamo e mesencéfalo. Ainda, outros (9%) também analisaram a resposta do eixo HPA ao estresse<sup>10, 13, 17</sup>, assim como os efeitos do estresse pré-natal sobre o comportamento, aprendizado, medo e ansiedade (31%)<sup>9, 10, 12, 14, 15, 28-30, 37, 38</sup>. Além disso, também há estudos<sup>18-20, 25, 27</sup> (15%) que analisaram os efeitos do estresse pré-natal sobre diferentes sistemas, como o endócrino, o cardiovascular e o musculoesquelético.

Ao analisar o comportamento de medo e ansiedade, os estudos que utilizaram estresse pré-natal ainda são controversos. Um estudo realizado em camundongos machos adultos<sup>15</sup> mostrou que o estresse pré-natal causa um aumento dos níveis de medo e ansiedade, mostrando uma hipolocomoção na análise feita com os testes comportamentais de labirinto em cruz elevada e campo aberto. Da mesma forma, em ratos machos e fêmeas<sup>14</sup>, o estresse pré-natal induz ao aumento da ansiedade nas fêmeas e déficit de aprendizagem nos machos, demonstrando que as diferenças dos efeitos do estresse podem depender da severidade e do período da prenhez. Porém, em outro estudo<sup>9</sup> realizado em camundongos machos e fêmeas, o estresse pré-natal melhora o desempenho motor dos animais, no entanto não houve alteração nos parâmetros de ansiedade. Já em outro estudo com ratos machos<sup>38</sup>, o estresse pré-natal diminuiu os níveis de medo e ansiedade, demonstrado através de uma maior locomoção, número de entradas e tempo nos braços abertos na análise comportamental.

Estudos que analisaram distúrbios hemodinâmicos em ratos machos e fêmeas<sup>19, 25</sup> demonstraram que o estresse pré-natal pode afetar o desenvolvimento e a maturação de órgãos específicos relacionados ao controle da pressão, como coração, vasos, rins e cérebro. Neste modelo, os animais quando expostos novamente ao estresse por contenção quando adultos,

---

não conseguem lidar de forma eficaz com essa situação, demonstrando aumento e variabilidade na pressão arterial, taquicardia e hipertensão induzida pelo estresse pré-natal.

Quando analisados memória e aprendizado, um estudo<sup>29</sup> mostrou que animais submetidos ao estresse pré-natal em ambos os sexos possuem um atraso na aprendizagem e demonstram prejuízos que afetam as memórias de curto e longo prazo, pois levam mais tempo para realizar algumas tarefas no campo de treino. Além disso, fêmeas expostas ao estresse pré-natal possuem aprendizagem espacial prejudicada quando analisadas 24 (vinte e quatro) meses depois. Da mesma forma, os machos apresentaram diminuição da memória espacial nas atividades de reconhecimento espontâneo<sup>17</sup>.

Estudos que analisaram a resposta do eixo HPA apontam para efeitos duradouros que causam um aumento da reatividade em diferentes níveis deste eixo. Um estudo<sup>17</sup> em ratas mostrou que há um aumento da responsividade do eixo HPA como consequência do estresse pré-natal, sendo que esses efeitos podem persistir até a senescência destas fêmeas. Ainda, há uma correlação da hiper-reatividade do eixo HPA com problemas cognitivos e envelhecimento. Outro estudo<sup>13</sup> realizado com ratos machos e fêmeas, também demonstrou que a responsividade do eixo HPA está aumentada. Os resultados apresentados mostram aumento da concentração de corticosterona, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da expressão do RNAm do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) em resposta a um novo estresse na vida adulta. Esses efeitos dependem do sexo, fazendo com que alterações específicas em diferentes níveis do eixo tenham sido demonstradas para machos e fêmeas.

### **Considerações finais**

Os resultados analisados nesta revisão indicam que o estresse no período pré-natal provoca alterações permanentes ao longo da vida em diversos sistemas. Estes efeitos parecem ser mais importantes no SNC e no controle dos mecanismos que regulam comportamentos de medo e ansiedade, assim como funções relacionadas a memória e aprendizagem. Ainda, o período gestacional em que o estresse é realizado parece ser importante na definição dessas alterações, assim como parece bem estabelecido que há diferenças nestas respostas entre machos e fêmeas. Um melhor entendimento de como situações adversas no período pré-natal

---

influencia o desenvolvimento e a resposta de importantes sistemas pode ajudar na prevenção e no tratamento das consequências oriundas do estresse nesse período em seres humanos.

---

**Referências**

1. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;851(1):311-35.
  2. Wright RJ. Stress and atopic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2005 Dec;116(6):1301-6.
  3. Glover V, O'Connor TG, O'Donnell K. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2010 Sep;35(1):17-22.
  4. Holmes MC, Abrahamsen CT, French KL, Paterson JM, Mullins JJ, Seckl JR. The mother or the fetus? 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 null mice provide evidence for direct fetal programming of behavior by endogenous glucocorticoids. *J Neurosci*. 2006 Apr 5;26(14):3840-4.
  5. Matthews SG. Antenatal glucocorticoids and programming of the developing CNS. *Pediatr Res*. 2000 Mar;47(3):291-300.
  6. Hauser J, Feldon J, Pryce CR. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. *Horm Behav*. 2009 Oct;56(4):364-75.
  7. Hodyl NA, Walker FR, Krivanek KM, Clifton V, Hodgson DM. Modelling prenatal bacterial infection: functional consequences of altered hypothalamic pituitary adrenal axis development. *Behav Brain Res*. 2007 Mar 12;178(1):108-14.
  8. Wright RJ. Prenatal maternal stress and early caregiving experiences: implications for childhood asthma risk. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007 Nov;21 Suppl 3:8-14.
  9. Pallares ME, Scacchi Bernasconi PA, Feleder C, Cutrera RA. Effects of prenatal stress on motor performance and anxiety behavior in Swiss mice. *Physiol Behav*. 2007 Dec 5;92(5):951-6.
  10. Ordyan NE, Pivina SG. Characteristics of the behavior and stress-reactivity of the hypophyseal-adrenal system in prenatally stressed rats. *Neurosci Behav Physiol*. 2004 Jul;34(6):569-74.
  11. Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology*. 2004 Aug;145(8):3778-87.
  12. Louvart H, Maccari S, Darnaudery M. Prenatal stress affects behavioral reactivity to an intense stress in adult female rats. *Brain Res*. 2005 Jan 7;1031(1):67-73.
  13. Garcia-Caceres C, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM, et al. Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2010 Nov;35(10):1525-35.
  14. Zagron G, Weinstock M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behav Brain Res*. 2006 Dec 15;175(2):323-8.
  15. Miyagawa K, Tsuji M, Fujimori K, Saito Y, Takeda H. Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Neurosci Res*. 2011 May;70(1):111-7.
-

16. Mairesse J, Vercoutter-Edouart AS, Marrocco J, Zuena AR, Giovine A, Nicoletti F, et al. Proteomic characterization in the hippocampus of prenatally stressed rats. *J Proteomics*. 2012 Mar 16;75(6):1764-70.
  17. Darnaudery M, Perez-Martin M, Belizaire G, Maccari S, Garcia-Segura LM. Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiol Aging*. 2006 Jan;27(1):119-27.
  18. Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *J Endocrinol*. 2004 May;181(2):291-6.
  19. Igosheva N, Klimova O, Anishchenko T, Glover V. Prenatal stress alters cardiovascular responses in adult rats. *J Physiol*. 2004 May 15;557(Pt 1):273-85.
  20. Yum MS, Chachua T, Veliskova J, Velisek L. Prenatal stress promotes development of spasms in infant rats. *Epilepsia*. 2012 Mar;53(3):e46-9.
  21. Yeh CM, Huang CC, Hsu KS. Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *J Physiol*. 2012 Feb 15;590(Pt 4):991-1010.
  22. Cai Q, Zhang B, Huang S, Wang T, Zhou T. The effects of prenatal stress on expression of CaMK-II and L-Ca<sup>2+</sup> channel in offspring hippocampus. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011 Aug;43(8):601-6.
  23. Zuena AR, Mairesse J, Casolini P, Cinque C, Alema GS, Morley-Fletcher S, et al. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PLoS One*. 2008;3(5):e2170.
  24. Cai Q, Zhu Z, Huang S, Li H, Fan X, Jia N, et al. Sex and region difference of the expression of ERK in prenatal stress offspring hippocampus. *Int J Dev Neurosci*. 2007 Jun;25(4):207-13.
  25. Igosheva N, Taylor PD, Poston L, Glover V. Prenatal stress in the rat results in increased blood pressure responsiveness to stress and enhanced arterial reactivity to neuropeptide Y in adulthood. *J Physiol*. 2007 Jul 15;582(Pt 2):665-74.
  26. Cai Q, Zhu Z, Li H, Fan X, Jia N, Bai Z, et al. Prenatal stress on the kinetic properties of Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels in offspring hippocampal CA3 pyramidal neurons. *Life Sci*. 2007 Jan 23;80(7):681-9.
  27. D'Mello A P, Liu Y. Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2006 Apr;31(3):395-406.
  28. Laviola G, Rea M, Morley-Fletcher S, Di Carlo S, Bacosi A, De Simone R, et al. Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies. *Eur J Neurosci*. 2004 Sep;20(6):1655-64.
  29. Meunier J, Gue M, Recasens M, Maurice T. Attenuation by a sigma1 (sigma1) receptor agonist of the learning and memory deficits induced by a prenatal restraint stress in juvenile rats. *Br J Pharmacol*. 2004 Jun;142(4):689-700.
  30. Gue M, Bravard A, Meunier J, Veyrier R, Gaillet S, Recasens M, et al. Sex differences in learning deficits induced by prenatal stress in juvenile rats. *Behav Brain Res*. 2004 Apr 2;150(1-2):149-57.
-

- 
31. Edwards HE, Dortok D, Tam J, Won D, Burnham WM. Prenatal stress alters seizure thresholds and the development of kindled seizures in infant and adult rats. *Horm Behav.* 2002 Dec;42(4):437-47.
  32. Baquedano E, Garcia-Caceres C, Diz-Chaves Y, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, et al. Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats. *PLoS One.* 2011;6(11):e27549.
  33. de Souza MA, Szawka RE, Centenaro LA, Diehl LA, Lucion AB. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiol Behav.* 2012 Feb 1;105(3):850-5.
  34. Sadaghiani MM, Saboory E. Prenatal stress potentiates pilocarpine-induced epileptic behaviors in infant rats both time and sex dependently. *Epilepsy Behav.* 2010 Jul;18(3):166-70.
  35. Carboni E, Barros VG, Ibba M, Silvagni A, Mura C, Antonelli MC. Prenatal restraint stress: an in vivo microdialysis study on catecholamine release in the rat prefrontal cortex. *Neuroscience.* 2010 Jun 16;168(1):156-66.
  36. Ordyan NE, Pivina SG. Effects of prenatal stress on the activity of an enzyme involved in neurosteroid synthesis during the "critical period" of sexual differentiation of the brain in male rats. *Neurosci Behav Physiol.* 2005 Nov;35(9):931-5.
  37. Bethus I, Lemaire V, Lhomme M, Goodall G. Does prenatal stress affect latent inhibition? It depends on the gender. *Behav Brain Res.* 2005 Mar 30;158(2):331-8.
  38. Ordyan NE, Pivina SG. Anxiety levels and neurosteroid synthesis in the brains of prenatally stressed male rats. *Neurosci Behav Physiol.* 2003 Nov;33(9):899-903.
  39. Berger MA, Barros VG, Sarchi MI, Tarazi FI, Antonelli MC. Long-term effects of prenatal stress on dopamine and glutamate receptors in adult rat brain. *Neurochem Res.* 2002 Nov;27(11):1525-33.
  40. Son GH, Chung S, Geum D, Kang SS, Choi WS, Kim K, et al. Hyperactivity and alteration of the midbrain dopaminergic system in maternally stressed male mice offspring. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jan 19;352(3):823-9.
  41. Meyer U, Yee BK, Feldon J. The neurodevelopmental impact of prenatal infections at different times of pregnancy: the earlier the worse? *Neuroscientist.* 2007 Jun;13(3):241-56.
  42. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mech Dev.* 2000 Mar 15;92(1):55-81.
-

---

## **CAPÍTULO III**

---

### **3 ARTIGO ORIGINAL**

**Título: Aaliação dos efeitos do estresse pré-natal sobre os parâmetros comportamentais e pulmonares em camundongos**

Autores: Mauro Henrique Moraes Vargas, Márcio Vinícius Fagundes Donadio

---

**Resumo**

**Introdução:** O período pré-natal é de suma importância para o desenvolvimento e a maturação de diversos sistemas e órgãos essenciais.

**Objetivo:** Avaliar os efeitos do estresse pré-natal sobre as respostas comportamentais, assim como possíveis alterações estruturais e do padrão celular no pulmão em um modelo experimental com camundongos Balb/c.

**Materiais e Métodos:** Foram utilizadas fêmeas Balb/c primíparas. Após a identificação da prenhez, os animais foram divididos em 3 grupos: CTLE (controle), PNS 1 (estresse em dias intercalados a partir do 8º dia da prenhez) e PNS 2 (estresse a partir do 15º dia da prenhez até o nascimento). O estresse pré-natal foi realizado através de contenção. Os animais foram pesados ao nascimento, dia 10 e no desmame (dia 21). Quando adultos, foram analisados o comportamento de medo/ansiedade por meio dos testes de campo aberto (CA) e labirinto em cruz elevada (LCE) e foi realizado lavado broncoalveolar (LBA) e análise histopatológica do pulmão.

**Resultados:** Não foram encontradas diferenças em relação ao peso dos animais entre os três grupos. A análise comportamental dos machos no teste do CA e LCE, não apresentou diferença significativa entre os grupos PNS 1 e PNS 2 em relação ao CTLE. Na análise do teste CA, as fêmeas do grupo PNS 1 apresentaram uma diminuição da distância total percorrida ( $p < 0,001$ ), aumento do tempo na periferia ( $p < 0,001$ ) e diminuição do tempo no centro ( $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo CTLE. O teste de LCE nas fêmeas não teve diferença significativa entre os três grupos. Quanto à análise do perfil celular no LBA e histologia pulmonar, também não houve diferenças entre os grupos.

**Conclusão:** O estresse pré-natal induz a alterações no comportamento de medo/ansiedade somente em camundongos Balb/c fêmeas e no modelo de estresse a partir do oitavo dia da prenhez, evidenciando que os efeitos do *programming* são possíveis nesse modelo. Por outro lado, o estresse pré-natal não provocou alterações basais no pulmão.

**Palavras-Chave:** estresse pré-natal. desenvolvimento pulmonar. comportamento.

**Abstract**

**Introduction:** The prenatal period is critical for the development and maturation of several organ systems essential.

**Objective:** To evaluate the effects of prenatal stress on behavioral responses, as well as possible structural changes and standard cell lung in an experimental model with Balb/c.

**Materials and Methods:** We used female Balb/c primiparous. After identification of pregnancy, the animals were divided into 3 groups: CTLE (control), PNS 1 (stress every other day from the 8th day of pregnancy) and PNS 2 (stress from day 15 of pregnancy until birth). The prenatal stress was accomplished through containment. The animals were weighed at birth, weaning and day 10 (day 21). As adults, we analyzed the behavior of fear/anxiety through field tests (AC) and elevated plus maze (EPM) was performed and bronchoalveolar lavage (BAL) and lung histopathology.

**Results:** No differences were found in relation to animal weight among the three groups. Behavioral analysis of the males in the test AC and EPM, showed no significant difference between groups PNS 1 and PNS 2 relative to CTLE. In the analysis of the test AC, females PNS 1 group showed a decrease in the total distance covered ( $P < 0.001$ ) increased time on the periphery ( $p < 0.001$ ) and decreased time the center ( $p < 0.001$ ) compared to the group CTLE. The test EPM in females was not significantly different among the three groups. The analysis of the cellular profile in BAL and lung histology, there were no differences between groups.

**Conclusion:** The prenatal stress induces changes in the behavior of fear/anxiety only in Balb/c mice and the stress model from the eighth day of pregnancy, suggesting that the effects of the programming are possible in this model. On the other hand, prenatal stress caused no alterations in basal lung.

**Keywords:** prenatal stress. lung development. behavior.

---

## Introdução

O estresse pré-natal durante o período gestacional (humanos) ou prenhez (ratos e camundongos), tanto de natureza física, química, psicológica, entre outros, modifica o estado de homeostase do organismo podendo levar a diversas alterações duradouras (neuroendócrinas, comportamentais e fisiológicas). Este processo é conhecido como *programming* ou programação, que consiste em uma adaptação que permite ao indivíduo ou animal superar as exigências proporcionadas pelo meio ambiente.<sup>1-3</sup>

O período pré-natal é de suma importância ao filhote, pois é nele que inicia o desenvolvimento e a maturação de diversos sistemas e órgãos essenciais para a sobrevivência e o crescimento normal.<sup>4,5</sup> Muitos estudos vêm evidenciando que as adversidades enfrentadas no período pré-natal podem estar implicadas na programação fetal e no surgimento de doenças na vida adulta.<sup>2,6</sup> Evidências de diferentes estudos indicam que o estresse pré-natal pode levar a alterações comportamentais de medo/ansiedade<sup>7,8</sup>, aumento da susceptibilidade a doenças cardiovasculares<sup>9,10</sup>, disfunções relacionadas a diabetes mellitus tipo 2<sup>2,9</sup>, aumento da susceptibilidade a inflamação e hiperresponsividade das vias aéreas<sup>11</sup>, além de efeitos que alteram o funcionamento e o desenvolvimento de estruturas do sistema nervoso central (SNC)<sup>12-14</sup>, tais como, hipotálamo, hipocampo, mesencéfalo, etc

Por outro lado, ainda são escassos os estudos avaliando os efeitos do estresse pré-natal sobre o sistema respiratório. Camundongos da linhagem Balb/c são os mais utilizados em modelos experimentais para estes estudos, sendo a asma uma das principais enfermidades deste sistema<sup>15,16</sup>. No único estudo até o momento, Pincus-Knackstedt et.al<sup>11</sup>, mostraram que o estresse pré-natal pode induzir a hiperresponsividade brônquica, associado com maior produção de muco e também a um aumento da inflamação nas vias aéreas num modelo murino de asma. Assim, ainda são pouco conhecidos os efeitos do *programming* no período neonatal em camundongos Balb/c, assim como possíveis diferenças entre machos e fêmeas. Com isso, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos do estresse pré-natal sobre as respostas comportamentais, assim como possíveis alterações estruturais e do padrão celular no pulmão em um modelo experimental com camundongos Balb/c.

---

## **Materiais e Métodos**

### **Animais**

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos Balb/c com origem do biotério do Instituto de Pesquisas Biomédicas – IPB da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS. Os animais foram mantidos em caixas acrílicas transparente, ciclo 12 horas claro/escuro, com livre acesso a comida e água, as trocas foram realizadas quinzenalmente. Todos os procedimentos realizados com estes animais estão de acordo com as exigências do Comitê de Ética e Pesquisa em Animais da PUCRS e com aprovação do mesmo com registro n° 11/00270.

### **Desenho Experimental**

Fêmeas adultas, primíparas, tiveram seu ciclo estral controlado e então foram mantidas com um macho por três dias, a prenhez foi identificada através de um *plug* vaginal. Após esta identificação as fêmeas foram separadas individualmente em suas caixas e divididas em três grupos diferentes, onde foi realizado o estresse por contenção no período pré-natal nos grupos PNS1, PNS2 e o grupo CTLE não sofreu nenhuma intervenção. Após o nascimento dos filhotes, foi realizado o desmame com vinte um dias, depois da identificação do sexo, fêmeas e machos foram isolados onde cada caixa teve no máximo cinco animais por caixa. Esses animais foram mantidos até a idade adulta (aproximadamente cinquenta e seis dias) onde foram realizados os testes comportamentais, com machos e fêmeas, de campo aberto e cruz elevada nos dias 57° e 58° respectivamente. No 59° somente as fêmeas foram anestesiadas com sobredose de (ketamina + xilazina) e foi realizada uma traqueostomia para a realização do lavado broncoalveolar, os mesmos tiveram a caixa torácica aberta, com rompimento do diafragma para a retirada do pulmão esquerdo para análise histopatológica.

---

## **Procedimentos**

### **Modelo de estresse por contenção**

Consiste em deixar o animal imóvel em um cilindro fechado com dimensões internas em milímetros (mm) (A x L x C): 34 x 42 x 100. O aparato é confeccionado em acrílico cristal de 4 mm, com frente e traseira removíveis e com sistema de travamento através de manípulos. Possui 10 furos laterais de 6 mm, para entrada e saída de ar.

### **Estresse pré-natal**

Após a identificação da prenhez, as fêmeas foram separadas individualmente em suas caixas e divididas em três diferentes grupos. O grupo PNS 1, fêmeas prenhas foram submetidas a um estresse por contenção por 30 minutos como descrito anteriormente. O estresse iniciou à partir da segunda semana da prenhez (oitavo dia) em dias intercalados, ou seja, um dia sim e outro não até o nascimento dos filhotes. O grupo PNS 2, fêmeas prenhas foram submetidas ao estresse por contenção e neste grupo o estresse teve início na última semana da prenhez (décimo quinto dia) por todos os dias até o nascimento dos filhotes. Já o grupo CTLE (controle), as fêmeas prenhas não sofreram estresse e foram mantidas em suas caixas acrílicas durante toda a gestação.

### **Pesagem dos filhotes**

Todos os filhotes dos grupos (CTLE, PNS 1 e PNS 2) tiveram seus pesos registrados em três momentos diferentes. No primeiro e no décimo dia de vida, a ninhada era pesada como um todo e o peso total dividido pelo número de filhotes. No vigésimo primeiro dia (desmame), os filhotes tiveram seus sexos identificados e foram pesados separadamente.

---

## **Análise Comportamental**

### **Teste do Campo Aberto**

Os animais dos grupos PNS 1, PNS 2 e CTLE quando adultos realizaram o procedimento do Campo Aberto (CA), onde foram testados conforme descrição de Blanchard e Blanchard<sup>17</sup>. O campo aberto é uma caixa de madeira (45 x 45 x 15 cm). A arena é dividida em 2 quadrantes pintados no chão, um nas zonas laterais da arena e outro na zona central. O procedimento consistiu na colocação do animal em um canto do campo aberto (escolhidos aleatoriamente) e na gravação de sua atividade em vídeo por 10 minutos, durante o ciclo claro. Comportamentos específicos foram determinados: distância total percorrida, tempo no centro e tempo na periferia (em segundos). O comportamento de medo inato foi verificado por meio de locomoção para a zona central do campo aberto com análises feitas pelo software Any Maze. No final do teste, os camundongos foram retirados da arena e a superfície foi higienizada com álcool a 70%.

### **Teste do Labirinto em Cruz Elevado**

Os camundongos dos grupos PNS 1, PNS 2 e CTLE foram testados no labirinto em cruz elevado (LCE), conforme descrição de Pellow et. al<sup>18</sup>. O LCE consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm com uma borda 1 cm de altura em torno dela) e dois braços fechados (30 x 5 x 15 cm) com um teto aberto, ficando 50 cm acima do chão. Foram analisados os seguintes fatores: distância total percorrida, tempo nos braços abertos e tempo nos braços fechados. O animal foi colocado na zona central com a cabeça de frente para um braço aberto, e permaneceu no LCE por 10 minutos, período no qual seu comportamento foi gravado para posterior análise com o software Any Maze. Após cada animal realizar o teste a superfície do labirinto foi higienizada com álcool a 70%.

---

### **Lavado Broncoalveolar (LBA)**

Os pulmões dos oito animais de cada um dos três grupos foram submetidos a uma lavagem por meio de um tubo endotraqueal, onde foi instilado através de uma seringa 1 ml de DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) por duas vezes no processo de “ida e volta” do líquido para os pulmões dos animais. A viabilidade celular foi determinada através de exclusão de azul de tripan, para a realização das lâminas (duas por animal) o pellet do LBA foi ressuscitado em 350µl de DPBS e 80µl foi colocado em cada posso e preparadas por *cytospin* com 500rpm por 5 minutos. Após isso, as lâminas foram coradas usando *Wright-Giemsa* para diferenciação do tipo celular. Células foram diferenciadas e analisadas em microscópio de luz de forma cega e determinadas a partir de pelo menos 400 leucócitos usando critérios de padrões hematológicos.

### **Análise Histopatologica**

Após a realização do LBA, os pulmões foram removidos e formalina a 10% foi instilada através de coluna de gravidade (20 cmH<sub>2</sub>O) e então, passou pelo processo de *overnight* para a desidratação do tecido, feito com álcool e xilol. Lâminas foram preparadas a partir de blocos de parafina de tecido pulmonar cortados em 3 µm com colorações específicas de hematoxilina-eosina HE (análise da inflamação), alcian blue (análise de produção de muco) e picrossírus (análise de deposição de colágeno).

### **Análise Estatística**

Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (EP) e as comparações entre os grupos experimentais foram realizadas através de uma análise de variância de duas vias (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

O peso corporal dos filhotes foi acompanhado desde o nascimento até o desmame como mostra a tabela 1. Não foram encontradas diferenças no peso dos filhotes estressados (PNS 1 e PNS 2) em relação ao grupo controle (CTLE).

Em relação à análise comportamental de medo/ansiedade, os machos, tanto no teste do campo aberto (distância total percorrida, tempo no centro e tempo na periferia), quanto no labirinto em cruz elevada (distância total percorrida, tempo nos braços fechados e abertos), não apresentaram diferenças significativas entre os grupos (CTLE, PNS 1 e PNS 2). Estes resultados são apresentados nas figuras 1 e 2, respectivamente.

Quanto ao comportamento de medo/ansiedade nas fêmeas, a análise dos dados no teste do CA demonstrou diferenças entre os grupos, evidenciando o efeito do estresse pré-natal sobre as fêmeas. A distância total percorrida foi significativamente ( $p < 0,001$ ) menor nos grupos PNS 1 e PNS 2 em comparação ao CTLE (Figura 3). Já em relação as variáveis de tempo no centro e tempo na periferia (Figura 3), o grupo PNS 1 apresentou uma diminuição ( $p < 0,001$ ) no primeiro e um aumento ( $p < 0,001$ ) no segundo em comparação ao CTLE. No entanto, quando analisado o teste do LCE (Figura 4), as variáveis de distância total percorrida, tempo nos braços abertos e tempo nos braços fechados, não apresentaram diferenças significativas entre os três grupos.

Quanto aos efeitos do estresse pré-natal sobre o perfil das células do pulmão, apresentado na Tabela 2, não há diferença significativa entre os grupos na contagem diferencial das células analisadas no LBA. Na avaliação da histologia pulmonar, foram analisados de forma qualitativa aspectos de inflamação, presença de muco e presença de colágeno. Não foram encontradas diferença entre os grupos (Figura 5).

## Discussão

No presente estudo, nós mostramos que o estresse pré-natal induz ao aumento do comportamento de medo/ansiedade em camundongos Balb/c fêmea, porém o mesmo não ocorreu nos machos, indicando que machos e fêmeas respondem de forma diferente aos efeitos do estresse. Muitos estudos ainda divergem quanto aos resultados do efeito do estresse

pré-natal sobre o comportamento de medo/ansiedade em roedores. Pincus-Knackstedt et.al<sup>11</sup>, no único estudo que avalia o comportamento de medo/ansiedade em camundongos Balb/c, mostrou que fêmeas submetidas a estresse pré-natal ficam menos tempo nos braços abertos em relação às fêmeas do grupo controle. Já outro estudo, semelhante ao nosso, porém em camundongos machos da linhagem ICR, dois tipos de estresse pré-natal foram usados (baixa e alta intensidade), sendo que somente o estresse pré-natal de alta intensidade alterou o comportamento de medo/ansiedade nos dois testes realizados (CA e LCE).<sup>19</sup> Por outro lado, no estudo feito por Pallares et.al<sup>20</sup>, em camundongos *Swiss*, não foram demonstradas alterações de medo/ansiedade tanto em machos quanto em fêmeas. No entanto, estudo realizado em ratos machos e fêmeas da linhagem *Sprague-Dawley*, mostrou que os machos respondem aos efeitos do estresse pré-natal diminuindo o tempo nos braços abertos em relação ao grupo controle, evidenciando o aumento do medo/ansiedade, porém nas fêmeas o resultado encontrado foi inverso.<sup>21</sup> Em contrapartida, o estudo de Zagron et.al<sup>8</sup>, em ratos *Wistar* machos e fêmeas encontrou resultados diferentes do estudo anterior, demonstrando que somente as fêmeas tem resposta ao estresse pré-natal, com diminuição do tempo nos braços abertos em relação ao grupo controle. De uma maneira geral, esses dados indicam uma grande variabilidade nos resultados encontrados na literatura e confirmam as diferenças sexuais. As evidências sugerem que os efeitos do estresse parecem estar ligados ao sexo, intensidade, período em que é realizado e também linhagem do roedor.

Os resultados do presente estudo apontaram que o período da realização do estresse pré-natal é de grande importância. Os animais do grupo PNS 1 (estresse em dias intercalados a partir do 8º dia de prenhez) apresentaram alterações comportamentais em relação aos controles, sendo que o mesmo não ocorreu no grupo PNS 2 (estresse com início no 15º dia da prenhez até o nascimento). A aplicação do estresse em um período mais inicial de desenvolvimento (o desenvolvimento estrutural do pulmão inicia aproximadamente pelo 8º ou 9º dia de prenhez)<sup>22</sup> poderia afetar de forma distinta diferentes parâmetros. Entretanto, a literatura mostra que a grande maioria dos estudos relacionados ao estresse pré-natal utiliza o período da última semana da gestação (15º dia).<sup>23-25</sup> Dois estudos analisaram os efeitos do estresse pré-natal em diferentes períodos da prenhez, um mostrou que o estresse pré-natal no período tardio da prenhez, aumenta a vulnerabilidade para convulsões,<sup>26</sup> enquanto o outro estudo não mostrou diferença no metabolismo da glicose entre os grupos estressados em diferentes períodos (primeira, segunda e terceira semana da prenhez).<sup>27</sup>

O estresse pré-natal por contenção tem sido mais estudado em modelos experimentais com roedores, mais especificamente, em ratos, sendo que a maior parte destes estudos possui desfechos relacionados ao desenvolvimento ou alteração de alguma estrutura do SNC.<sup>12,14,21</sup> No entanto, para estudos que visam avaliar alterações pulmonares, por exemplo, o modelo mais utilizado é o de camundongos Balb/c.<sup>15,16</sup> Somente um estudo na literatura analisou os efeitos do estresse pré-natal em um modelo de asma com ovalbumina (OVA), sendo que este estudo, assim como o nosso, mostrou que é possível a realização do *programming* nestes animais, já que ambos demonstraram alterações comportamentais (medo/ansiedade) em fêmeas.<sup>11</sup> Ainda são necessários mais estudos com esse modelo para aprofundar o conhecimento sobre tais alterações.

Os nossos resultados não apresentaram alterações estruturais e modificações no perfil celular quando os grupos estressados foram comparados aos controles. No entanto, analisamos apenas os efeitos basais do estresse pré-natal sobre o pulmão, sem indução de asma ou qualquer outro estímulo. Já no estudo de Pincus-Knackstedt et.al<sup>11</sup>, o estresse pré-natal induziu alterações pulmonares como aumento da produção de muco e hiperreatividade das vias aéreas, associado com aumento da inflamação (grande número de eosinófilos encontrados no LBA), em um modelo murino com OVA. Estes dados indicam que os efeitos do estresse pré-natal parecem não alterar a estrutura basal do pulmão, mas sim aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de um processo inflamatório pulmonar após a sua indução.

Os resultados do presente estudo demonstram que o estresse pré-natal induz a alterações no comportamento de medo/ansiedade somente em camundongos Balb/c fêmeas e no modelo de estresse a partir do oitavo dia da prenhez, evidenciando que os efeitos do *programming* são possíveis nesse modelo. Por outro lado, o estresse pré-natal não provocou alterações basais no pulmão. Mais estudos devem ser desenvolvidos para tentar entender melhor os efeitos do estresse pré-natal sobre o sistema respiratório e também as possíveis diferenças entre os sexos.

**Referências**

1. Chrousos GP. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;851(1):311-35.
2. Lesage J, Del-Favero F, Leonhardt M, Louvart H, Maccari S, Vieau D, et al. Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behaviour disturbances in the aged rat. *The Journal of endocrinology*. 2004;181(2):291-6.
3. Wright RJ. Stress and atopic disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116(6):1301-6.
4. Hauser J, Feldon J, Pryce CR. Direct and dam-mediated effects of prenatal dexamethasone on emotionality, cognition and HPA axis in adult Wistar rats. *Hormones and behavior*. 2009;56(4):364-75.
5. Hodyl NA, Walker FR, Krivanek KM, Clifton V, Hodgson DM. Modelling prenatal bacterial infection: functional consequences of altered hypothalamic pituitary adrenal axis development. *Behavioural brain research*. 2007;178(1):108-14.
6. Darnaudery M, Perez-Martin M, Belizaire G, Maccari S, Garcia-Segura LM. Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiology of aging*. 2006;27(1):119-27.
7. Weinstock M. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 2008;32(6):1073-86.
8. Zagron G, Weinstock M. Maternal adrenal hormone secretion mediates behavioural alterations induced by prenatal stress in male and female rats. *Behavioural brain research*. 2006;175(2):323-8.
9. Russell JA, Douglas AJ, Brunton PJ. Reduced hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress responses in late pregnancy: central opioid inhibition and noradrenergic mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1148:428-38.
10. Igosheva N, Klimova O, Anishchenko T, Glover V. Prenatal stress alters cardiovascular responses in adult rats. *The Journal of physiology*. 2004;557(Pt 1):273-85.
11. Pincus-Knackstedt MK, Joachim RA, Blois SM, Douglas AJ, Orsal AS, Klapp BF, et al. Prenatal stress enhances susceptibility of murine adult offspring toward airway inflammation. *J Immunol*. 2006;177(12):8484-92.
12. Baquedano E, Garcia-Caceres C, Diz-Chaves Y, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, et al. Prenatal stress induces long-term effects in cell turnover in the hippocampus-hypothalamus-pituitary axis in adult male rats. *PloS one*. 2011;6(11):e27549.
13. Son GH, Chung S, Geum D, Kang SS, Choi WS, Kim K, et al. Hyperactivity and alteration of the midbrain dopaminergic system in maternally stressed male mice offspring. *Biochemical and biophysical research communications*. 2007;352(3):823-9.
14. Garcia-Caceres C, Lagunas N, Calmarza-Font I, Azcoitia I, Diz-Chaves Y, Garcia-Segura LM, et al. Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2010;35(10):1525-35.
15. Hamelmann E, Tateda K, Oshiba A, Gelfand EW. Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model. *Allergy*. 1999;54(4):297-305.

- 
16. Olmez D, Babayigit A, Erbil G, Karaman O, Bagriyanik A, Yilmaz O, et al. Histopathologic changes in two mouse models of asthma. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2009;19(2):132-8.
  17. Blanchard DC, Blanchard RJ. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual review of psychology*. 1988;39:43-68.
  18. Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1985;14(3):149-67. Epub 1985/08/01.
  19. Miyagawa K, Tsuji M, Fujimori K, Saito Y, Takeda H. Prenatal stress induces anxiety-like behavior together with the disruption of central serotonin neurons in mice. *Neuroscience research*. 2011;70(1):111-7.
  20. Pallares ME, Scacchi Bernasconi PA, Feleder C, Cutrera RA. Effects of prenatal stress on motor performance and anxiety behavior in Swiss mice. *Physiology & behavior*. 2007;92(5):951-6.
  21. Zuena AR, Mairesse J, Casolini P, Cinque C, Alema GS, Morley-Fletcher S, et al. Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PloS one*. 2008;3(5):e2170.
  22. Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. *Mechanisms of development*. 2000;92(1):55-81.
  23. Yeh CM, Huang CC, Hsu KS. Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF. *The Journal of physiology*. 2012;590(Pt 4):991-1010.
  24. Cai Q, Zhang B, Huang S, Wang T, Zhou T. The effects of prenatal stress on expression of CaMK-II and L-Ca<sup>2+</sup> channel in offspring hippocampus. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2011;43(8):601-6.
  25. Louvart H, Maccari S, Darnaudery M. Prenatal stress affects behavioral reactivity to an intense stress in adult female rats. *Brain research*. 2005;1031(1):67-73.
  26. Edwards HE, Dortok D, Tam J, Won D, Burnham WM. Prenatal stress alters seizure thresholds and the development of kindled seizures in infant and adult rats. *Hormones and behavior*. 2002;42(4):437-47.
  27. D'Mello A P, Liu Y. Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring. *Psychoneuroendocrinology*. 2006;31(3):395-406.
-

Tabela 1. Controle do peso dos animais.

Grupos	Nascimento (g)	10° dia (g)	Machos (g)	Fêmeas (g)
Controle	1,69±0,12	6,92±0,20	10,72±0,28	10,23±0,35
PNS 1	1,80±0,09	6,54±0,15	10,30±0,43	10,31±0,52
PNS 2	1,59±0,09	6,93±0,30	10,86±0,26	10,72±0,41

Valores expressos em média e erro padrão. O crescimento dos filhotes foi monitorado pelo aumento do peso corporal (g), desde o nascimento até o desmame. O número dos animais variou de acordo com cada grupo (n= 6 – 10). Para a obtenção do peso ao nascimento e peso ao 10° dia, em ambos os grupos, foram pesados todos os animais de uma mesma ninhada e o peso total foi dividido pelo número de filhotes gerando um valor médio por cada ninhada. Já o peso dos machos e peso das fêmeas, cada animal foi pesado separadamente no dia do desmame.

Tabela 2. Contagem diferencial de células do lavado broncoalveolar (LBA).

Grupos	Macrófagos (%)	Neutrófilos (%)	Linfócitos (%)	Eosinófilos (%)
Controle (n=8)	99,50±0,14	0,34±0,12	0,15±0,09	-
PNS 1 (n=8)	99,50±0,17	0,34±0,12	0,21±0,11	-
PNS 2 (n=8)	99,61±0,13	0,14±0,07	0,25±0,09	-

Valores expressos em média e erro padrão. PNS 1 (estresse intercalado a partir do 8° dia da prenhez) e PNS 2 (estresse com início no 15° dia da prenhez até o nascimento). (-): indica ausência de eosinófilos no LBA.

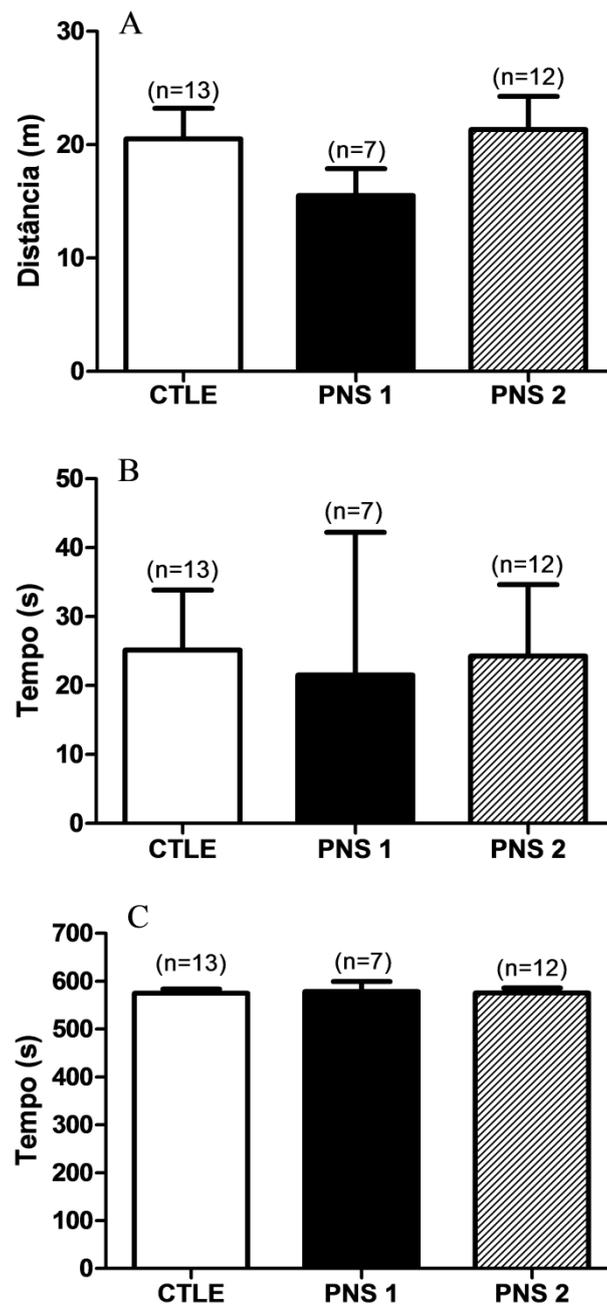


Figura 1. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental dos machos dos grupos (CTLE- controle, PNS 1- estresse intercalado a partir do 8° dia da prenhez e PNS2 – estresse com início no 15° dia da prenhez até o nascimento) no teste do campo aberto. (A) distância total percorrida, (B) tempo no centro e (C) tempo na periferia. Não houve diferença significativa entre os grupos nas três variáveis analisadas.

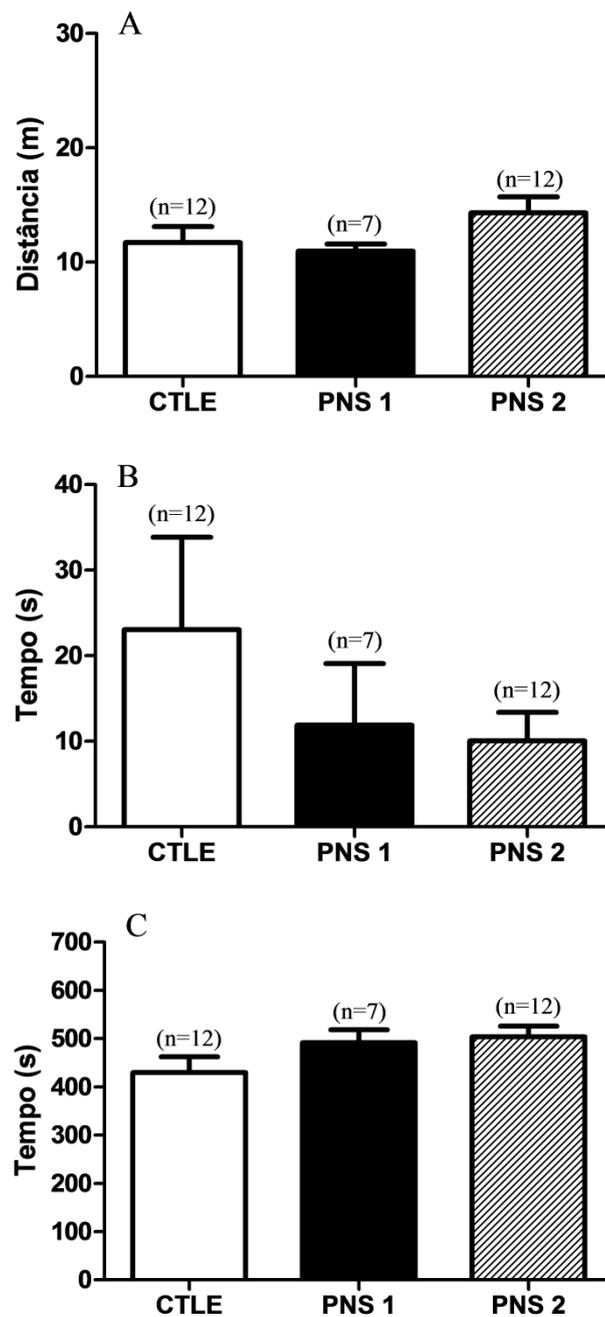


Figura 2. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental dos machos dos grupos (CTLE- controle, PNS 1- estresse intercalado a partir do 8° dia da prenhez e PNS2 – estresse com início no 15° dia da prenhez até o nascimento) no teste do labirinto em cruz elevado. (A) distância total percorrida, (B) tempo nos braços abertos e (C) tempo nos braços fechados. Não houve diferença significativa entre os grupos nas três variáveis analisadas.

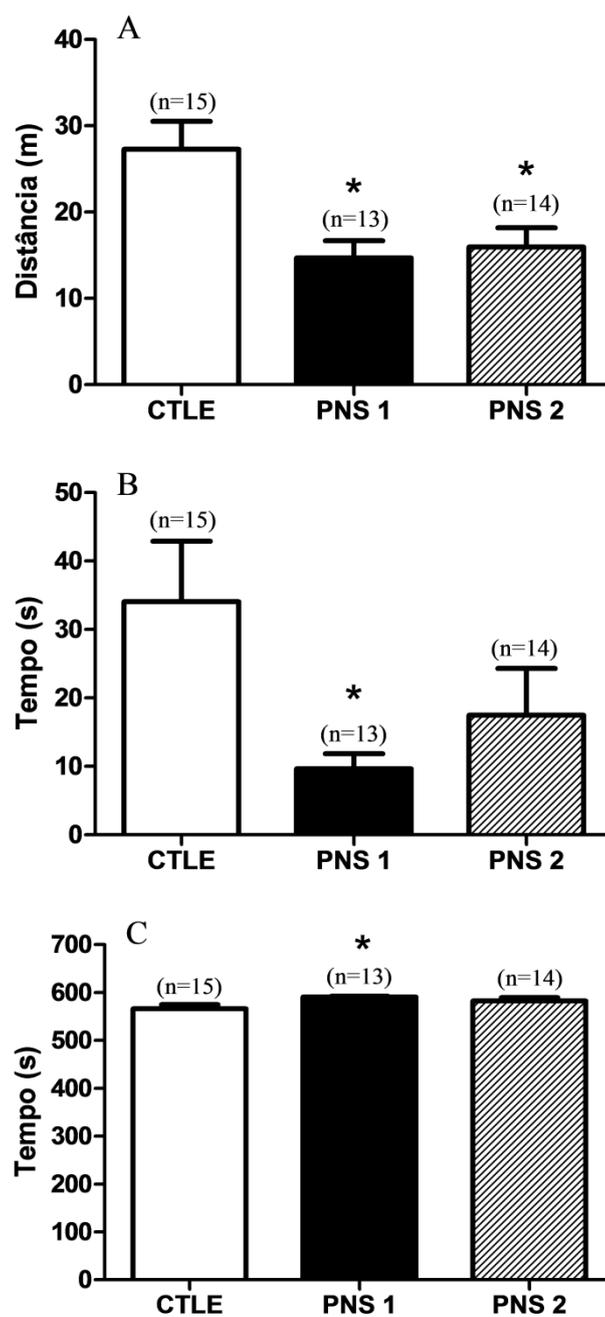


Figura 3. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental das fêmeas dos grupos (CTLE - controle, PNS 1- estresse intercalado a partir do 8° dia da prenhez e PNS2 – estresse com início no 15° dia da prenhez até o nascimento) no teste do campo aberto. (A) distância total percorrida, (B) tempo no centro e (C) tempo na periferia. \*indica diferença significativa em comparação ao grupo controle ( $p < 0,001$ ).

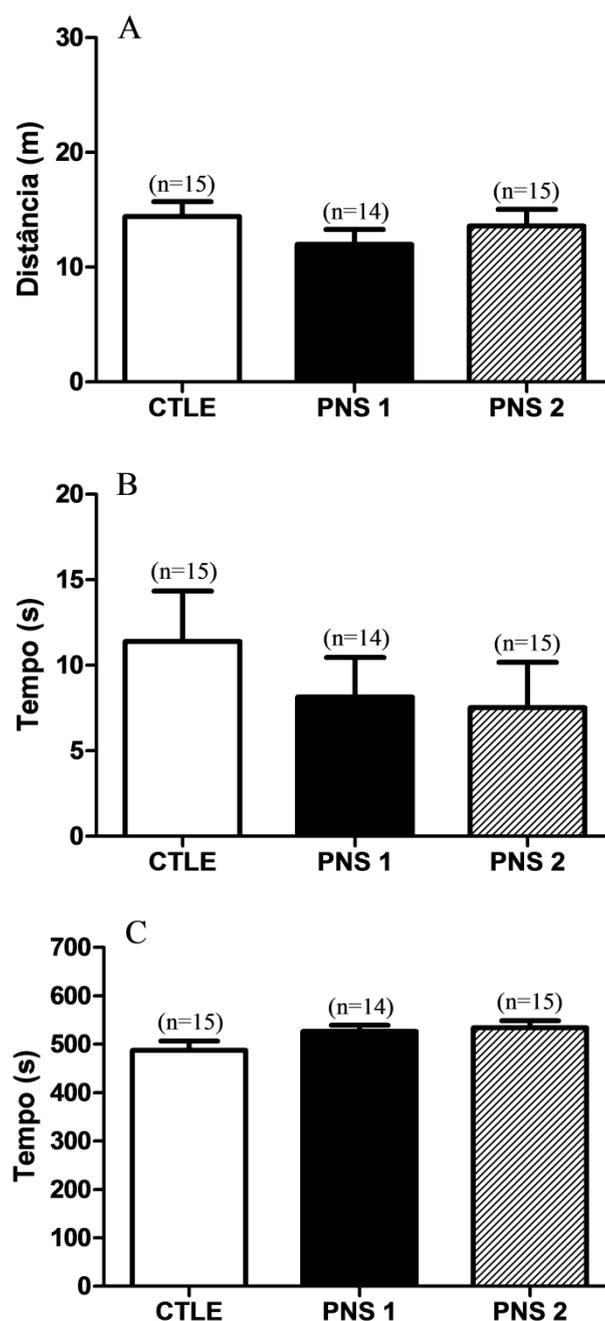
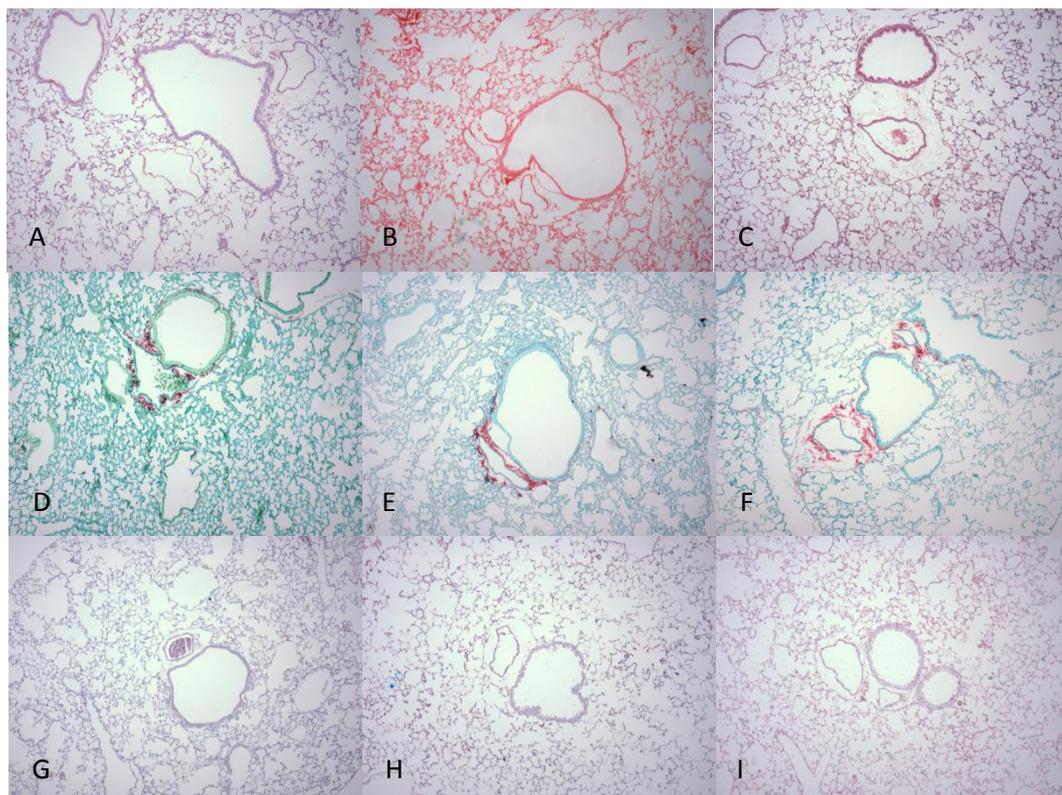


Figura 4. Gráfico em barras demonstrando a análise comportamental das fêmeas dos grupos (CTLE - controle, PNS 1- estresse intercalado a partir do 8° dia da prenhez e PNS2 – estresse com início no 15° dia da prenhez até o nascimento) no teste do labirinto em cruz elevado. (A) distância total percorrida, (B) tempo nos braços abertos e (C) tempo nos braços fechados. Não houve diferença significativa entre os grupos nas três variáveis analisadas.



**Figura 5.** Análise de cortes histológicos do tecido pulmonar de fêmeas, emblocados em parafina. A-D-G grupo CTLE (controle), B-E-H grupo PNS 1 (estresse em dias intercalados a partir do 8º dia da prenhez) e C-F-I grupo PNS 2. (Coloração com HE, (A-B-C), coloração com picrosirius (D-E-F) e coloração com alcian blue (G-H-I). Todos os cortes foram de 3µ e fotografados em um aumento de 10x.

---

## **CAPÍTULO IV**

---

## CONCLUSÃO

De uma maneira geral, o presente estudo demonstra que o estresse pré-natal induz a alterações no comportamento de medo/ansiedade em camundongos Balb/c fêmeas e no modelo de estresse a partir do oitavo dia da prenhez, evidenciando que os efeitos do *programming* são possíveis nesse modelo. Por outro lado, o estresse pré-natal não provocou alterações basais no pulmão. Mais estudos devem ser desenvolvidos para tentar entender melhor os efeitos do estresse pré-natal sobre o sistema respiratório e também as possíveis diferenças entre os sexos.

---